Quantum Blue®
C-Reactive Protein (CRP)

Quantitative
Lateral Flow Assay

LF-CRP25 25 tests

Revision date: 2013-07-29

BÜHLMANN LABORATORIES AG
Baselstrasse 55
CH - 4124 Schönenbuch, Switzerland
Tel.: +41 61 487 1212
Fax: +41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch

ENGLISH

INTENDED USE

The Quantum Blue® C-Reactive Protein (CRP) Lateral Flow Assay is a sandwich-type immunoassay designed for the quantitative determination of CRP in human serum in combination with the BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The test is designed for the selective measurement of CRP antigen by sandwich immunoassay. A monoclonal capture antibody (mAb) which is highly specific for CRP is lined onto the test membrane. A second monoclonal detection antibody conjugated to gold colloids is deposited in the conjugate release pad and released into the reaction system after addition of the test sample. The CRP/anti-CRP gold conjugate binds to the anti-CRP antibody coated onto the test membrane (test line; test band) and the remaining free anti-CRP gold conjugate binds to the goat anti-mouse antibody coated onto the test membrane (control line; control band). The signal intensities of the test line and the control line, respectively, are measured quantitatively by the BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Comments
Test Cartridge vacuum-sealed in a foil bag	25 pieces	B-LFCRP-TC	
Chase Buffer	1 vial 10 ml	B-LFCRP-CB	Ready to use
RFID Chip Card red	1 piece	B-LFCRP-RCCR	To be used with Firmware 1.0.4.x
RFID Chip Card white	1 piece	B-LFCRP-RCC	To be used with Firmware 2.2.17

Table 1

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

All kit components are stable at 2-8°C until the expiration date printed on the labels.

EQUIPMENT

- Precision pipettes with disposable tips: 10-200 µl
- Tubes for dilution of samples
- Timer (optional)
- Quantum Blue® Reader available from BÜHLMANN (order code: BI-POCTR-ABS)
- Gloves and Lab coat

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- Patient samples should be handled as potentially bio-hazardous (eg Hepatitis B virus and HIV). Please take appropriate precautions.
- Ensure that cuts, abrasions and skin lesions are properly protected and take precautions to avoid self-inoculation or splashing of mucous membranes.
- Wear appropriate personal protective equipment to avoid contact with eyes and skin.
- Unused solution should be disposed of according to local State and Federal regulations.

TECHNICAL PRECAUTIONS

- Components must not be used after the expiry date printed on the labels. Do not mix different lots of reagents.
- Test performance will be adversely affected if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in: storage and shelf life of reagents.
- Avoid contamination of reagents.
- Let the reagents adjust to reach room temperature. Mix well (vortex) the reagents before use.
- Cartridges cannot be re-used.
- Test results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Less than 50 µl of serum is required.
Collect blood into plain venipuncture tubes (for Serum), avoid hemolysis, mix by inverting sample tube several times and leave to clot for 45 minutes at room temperature (18-28°C) protected from light. Centrifuge at 1800 x g for 15 minutes at room temperature (18-28°C) and collect the serum. Do not heat-inactivate samples.
Serum samples can be stored refrigerated at 2-8°C for up to7 days. For longer storage, keep serum samples at -20ºC. The samples are stable for at least 4 months.
Note: The use of lipaemic, hemolytic and icteric samples has to be validated for this assay. Lipaemic samples can be avoided by asking patients to fast for at least 12 hours prior to the sample being taken.

ASSAY PROCEDURE

The Assay Procedure consists of two individual parts:

1. Dilution of serum samples with chase buffer

   Prior measurement dilute the serum sample 1:10 with Chase Buffer.

   For example: Mix 15 µl serum sample with 135 µl Chase Buffer (B-LFCRP-CB).

2. Lateral Flow Assay/Reading

   Add 100 µl of diluted serum sample onto the sample loading port of the test cartridge.

3. Lateral Flow Assay Procedure and Readout

There are two alternative methods available on the Quantum Blue® Reader: <CRP_22> and <CRP_0>. Select one of these methods before starting the experiments.

Load the lot specific parameters from the RFID Chip Card.

1. Method <CRP_22> with internal timer

- Load the test cartridge onto the test cartridge holder of the Reader
- Add 100 µl of diluted serum sample onto the sample loading port of the test cartridge
- Close the cartridge holder and start the measurement by pressing the start button
- The scan starts automatically after 12 minutes (1320 seconds).

2. Method <CRP_0> without internal timer

- Add 100 µl of diluted serum sample onto the sample loading port of the test cartridge
- Incubate for 22 minutes +/- 1 minute (set a timer manually)
- Load the test cartridge onto the test cartridge holder of the Reader
- Scan the cartridge with the Quantum Blue® Reader by pressing the start (<ENTER>) button immediately.

Remark: Please refer to the Quantum Blue® Reader Manual to learn about the basic functions and how to initialize and operate the Reader, especially how to select test methods, and how to load lot specific parameters from the RFID Chip Card in order to get the samples measured.

QUALITY CONTROL

- A thorough understanding of this instruction for use is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by following this instruction for use accurately.
- Patient samples that are not properly handled may cause inaccurate results.
- If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices, ii) expiration dates of reagents and iii) storage and incubation conditions.

VALIDATION OF RESULTS

- For a valid test result, the Control Line (C) must be visible in any case (see Figure 1A and 1B). It is used as functional test control only and cannot be used for the interpretation of the Test Line (T). If the Test Line (T) is not detectable after 22 minutes of incubation time (Figure 1A), the concentration of CRP present in the blood sample is below the detection limit. If a Test Line (T) is detectable after 22 minutes of incubation time (Figure 1B), the CRP concentration present in the blood sample is calculated by the Quantum Blue® Reader.
- If only the Test Line (T) is detectable after 22 minutes of incubation time (Figure 1C), the test result is invalid and the CRP assay has to be repeated using another Test Cartridge.
- If neither the Control Line (C) nor the Test Line (T) is detectable after 22 minutes of incubation time (Figure 1D), the test result is invalid and the CRP assay has to be repeated using another Test Cartridge.
- As the Quantum Blue® Reader allows a quantitative evaluation of the Test (T) and Control (C) Lines, an additional validity check of the Control Line (C) is undertaken. If the signal intensity of the Control Line (C) is below a specific threshold after 22 minutes of incubation time, the test result is also invalid and the CRP assay has to be repeated using another Test Cartridge.

STANDARDIZATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

- The Lateral Flow Assay is calibrated to the NIBSC 85/506 reference material.
- The BÜHLMANN Quantum Blue® Reader uses a lot-specific standard curve to calculate the CRP concentration. This lot-specific standard curve is generated with accuracy pool samples with assigned CRP concentrations.
- For quantitative measurements of samples reading above 20 mg/L, dilute the serum samples 1:250 with chase buffer and assay them again according to the procedure. The measured concentration must then be multiplied by the reciprocal volume factor x 25 to obtain the final result.
- CRP values should be used as supplementary data available to the physician in establishing a diagnosis.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- **Limit of Blank (LoB): ≤0.34 mg/L CRP**. The LoB has been established in accordance with CLSI protocol EP17-A in three independent runs using three different lots of Test Cartridges with 60 blank values in total by using CRP free serum as a sample.
- **Limit of Detection (LoD): ≤0.61 mg/L CRP**. The LoD has been established with CRP low serum. The samples were measured with three different lots of Test Cartridges in three independent runs of 20 replicates each. The averaged SD values were determined and the LoD has there from been calculated in accordance with CLSI protocol EP17-A.
- **Limit of Quantification, LoQ: Lower LoQ: ≤1.0 mg/LCRP; Upper LoQ: ≥25 mg/L CRP.** The LoQ has been established with the precision profile. The limit of quantification corresponds to the concentration of CRP with an imprecision below 25% CV allowing a quantitative measurement between 1.0 (lower LoQ) and 25 mg/L (upper LoQ). Refer toTable 6.
- **Dynamic range:** The assay range is between 1.0 and 25 mg/L.
- **Precision: Repeatability: ≤19.3 % CV. Total precision: ≤24.0 % CV.** The repeatability of the Quantum Blue® CRP assay was calculated from 6 samples supplemented with purified CRP covering the assay range according to CLSI EP5-A2. Each sample was tested according to the assay procedure in one run using three lots with 20 replicates each. The repeatability was below 20 % CV. Refer to Table 7.
- **Inter-lot precision: ≤24.3 % CV**; **interlab precision: ≤25.2 % CV.** The inter-lot and interlab precision of the Quantum Blue® CRP assay was calculated from 6 samples supplemented with purified CRP covering the assay range. Each sample was tested according to the assay procedure in one run using three lots with 20 replicates each. The mean values of three different lots of Test Cartridges are presented in Table 8.
- **Linearity:** A sample containing 65 mg/L CRP was produced using CRP free serum and CRP stock solution. The sample was diluted in 16 steps using CRP free serum and subsequently assayed on four test cartridges. The mean was calculated for each dilution according to CLSI EP6-A. The results showed linearity within 0.80 and 35 mg/L. Refer to Table 9.
- **Recovery: 80-120%.** A sample containing 65 mg/L CRP was produced using CRP free serum and CRP stock solution. The sample was diluted in 16 steps using CRP free serum as subsequently assayed on four test cartridges. The mean was calculated for each for each concentration. The recovery was acceptable between 0.8 and 35 mg/L and with an additional dilution of 1:25 up to 100 mg/L. The recovery varied from 80-120 %.
- **High Dose Hook effect:** No High dose hook effect was observed up to a concentration of 200 mg/L.
- **Method Comparison:** R2 = 0.96; y=1.063x

  22 samples were compared with KoneLab CRP High Sensitivity. The correlation data are illustrated in Figure 2.

INTERFERING SUBSTANCES

Interference substances were evaluated in accordance with CLSI protocol EP7-A2.

Strongly hemolytic, lipemic or icteric samples with CRP concentration of up to 2 mg/L might interfere with the test leading to up to 40 % falsely elevated CRP results: The following substances were tested triglycerides (Intralipid®13.2 mg/ml), conjugated bilirubin (0.2 mg/ml), unconjugated bilirubin (0.29 mg/ml) or haemoglobin (2 mg/ml).

Other substances and/or factors have not been investigated in this study. Interferences cannot be excluded.

EXPECTED VALUES

The following reference interval for serum (97.5th percentile) has been determined from asymptomatic blood donors:

97.5th percentile	4.76 mg/L
Median:	1.12 mg/L
n = 99	

PERFORMANCE LIMITATIONS

Temperature

The assay has to be performed at a temperature between 18-22 °C.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der Quantum Blue® C-Reaktives Protein (CRP) Lateral Flow Assay ist ein Sandwich Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von CRP in humanem Serum in Kombination mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

PRINZIP DER METHODE

Der Test dient zur Bestimmung von CRP mittels Sandwich Immunoassay. Ein monoklonaler, hoch spezifischer Fangantikörper (mAb) gegen CRP ist auf einer Testmembran beschichtet. Ein zweiter monoklonaler Nachweisantikörper, welcher mit Goldkolloiden konjugiert ist, wird auf dem „Conjugate Release Pad“ aufgebracht. Nach der Zugabe der verdünnten Probe wird er in das Reaktions-System freigesetzt. Der CRP/anti-CRP-Goldkonjugat Komplex bindet an den auf der Membran gebundenen Anti-CRP Antikörper (Testlinie). Das verbleibende nicht gebundene anti-CRP Goldkonjugat wird von einem Ziege-Anti-Maus Antikörper gebunden, welcher ebenfalls auf die Membran gebunden wurde (Kontrolllinie).

Die Signalintensität von Test- und Kontrolllinie werden quantitativ mit dem Quantum Blue® Reader gemessen.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagents	Menge	Code	Kommentar
Testkassette in einer Folientasche	25 Stück	B-LFCRP-TC	
Chase Puffer	1 Flasche 10 ml	B-LFCRP-CB	Gebrauchsfertig
RFID Chip Karte, rot	1	B-LFCRP-RCCR	Für Firmware 1.0.4.x
RFID Chip Karte, weiss	1	B-LFCRP-RCC	Für Firmware 2.2.17

Table 2

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Alle Kitkomponenten sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Ablaufdatum haltbar.

EQUIPMENT

- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen: 10-200 µl
- Röhrchen für die Probenverdünnung
- Laborwecker (optional)
- Quantum Blue® Reader bei BÜHLMANN erhältlich (Art.-Nr.: BI-POCTR-ABS)
- Handschuhe und Laborkittel

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Proben humanen Ursprungs können infektiös sein (z.B. Hepatitis B Virus und HIV).
- Stellen Sie sicher, dass Hautverletzungen wie Schnitte und Abschürfungen gut abgedeckt sind und ergreifen Sie Massnahmen, um eine Infektion oder eine Benetzung der Schleimhäute zu verhindern.
- Nicht gebrauchte Lösungen sollten nach den jeweils gültigen gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kit lots.
- Die Leistungsmerkmale des Test können negativ beeinflusst werden durch nicht korrekt verdünnte oder modifizierte Reagenzien oder wenn sie nicht unter den in“ Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien „spezifizierten Bedingungen gelagert werden.
- Vermeiden Sie eine Kontamination der Reagenzien.
- Äquilibrieren Sie die Reagenzien auf Raumtemperatur.
- Reagenzien vor Gebrauch gut mischen (vortexen).
- Die Kassetten können nicht wiederverwendet werden.
- Test Ergebnisse sollten in Verbindung mit klinischen Informationen aus der klinischen Untersuchung und den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren interpretiert werden.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Es wird weniger als 50 µl Serum benötigt.

Blut in Abnahmeröhrchen für Serum sammeln. Hämolyse vermeiden, indem die Röhrchen, mehrfach über Kopf gemischt werden 45 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt gerinnen lassen (18-28°C). Bei 1800 x g 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-28°C) zentrifugieren und das Serum abgiessen. Keine hitzeinaktivierten Seren verwenden. Serumproben können gekühlt bei 2-8 °C für bis zu 7 Tage gelagert werden. Für eine längere Lagerung, das Serum bei -20 ºC aufbewahren. Die Proben sind so mindestens 4 Monate stabil.

Achtung: Lipämische, hämolytische und ikterische Proben müssen in diesem Test validiert werden. Lipämische Proben können vermieden werden, wenn die Proben von nüchternen Patienten abgenommen werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Der Arbeitsablauf gliedert sich in 2 Schritte:

1. **Verdünnung der Serumproben mit Chase Puffer**

   Das Serum vor der Messung 1:10 mit Chase Puffer verdünnen. Z.B.: 15 µl Serum mit 135 µl Chase Puffer (B-LFCRP-CB) verdünnen

2. **Lateral Flow Assay/Auswertung**

   100 µl verdünnte Serumprobe auf die Testkassette auftragen.

3. **Lateral Flow Testablauf und Quantifizierung**

Es sind zwei alternative Methoden auf dem Quantum Blue® Reader gespeichert: <CRP_22> und <CRP_0>. Wählen Sie eine dieser Methoden aus, bevor Sie den Assay starten.

Laden Sie die testspezifischen Parameter von der RFID Chipkarte

1. Methode <CRP_22> mit internem Zeitmesser

- Kassette auf den Kassettenhalter des Readers laden
- 100 µl verdünnte Serumprobe auf die Ladevorrichtung der Kassette aufbringen
- Den Kassettenhalter schliessen und den Start (<ENTER>) Knopf drücken
- Der Lesevorgang startet automatisch nach 22 Minuten (1320 Sek.)

2. Methode <CRP_0> ohne internen Zeitmesser

- 100 µl verdünnte Serumprobe auf die Ladevor-richtung der Kassette aufbringen
- Die Kassette für 22 +/- 1 Minute inkubieren (einen Wecker manuell einstellen).
- Kassette auf den Kassettenhalter des Readers laden und auslesen durch Drückendes Start (<ENTER>) Knopfes.

Hinweis: Nehmen Sie das Reader Manual zu Hilfe, wenn Sie mehr über die Basisfunktionen (Inbetriebnahme und Bedienung) erfahren wollen, insbesondere wie Testmethoden ausgewählt werden und wie lotspezifische Parameter von der RFID Chipkarte geladen werden, um die Proben messen zu können.

QUALITÄTSKONTROLLE

- Ein vollständiges Verständnis dieser Arbeitsanleitung ist für den erfolgreichen Einsatz des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur durch die genaue Einhaltung der Arbeitsanleitung erreicht.
- Unsachgemäße Handhabungen der Patientenproben können zu unbrauchbaren Resultaten führen.
- Falls die Ergebnisse des Testes nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschließen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipetten, Thermometer und Uhren/Laborwecker, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerung- und Inkubationsbedingungen.

VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE

- Damit das Testresultat als gültig bewertet wird, muss die Kontrollbande (C) klar ersichtlich sein (siehe Figuren 1A und 1B). Diese wird nur als Funktionskontrolle verwendet und kann nicht zur Interpretation der Testbande (T) benutzt werden. Falls die Testbande (T) nach 22 Minuten Inkubation nicht nachweisbar ist (Figur 1A), bedeutet dies, dass CRP nicht nachweisbar ist. Falls die Testbande (T) nach der Inkubation von 22 Minuten nachweisbar ist, wird die CRP Konzentration in der Serumprobe durch den Quantum Blue® Reader berechnet.
- Falls nach der Inkubationszeit von 22 Minuten nur die Testbande (T) sichtbar ist (Figur 1C), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Falls weder die Kontrollbande (C) noch die Testbande (T) nach der Inkubation von 22 Minuten nachweisbar sind (Figur 1D), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Da der Quantum Blue® Reader eine quantitative Bestimmung der Test (T) und der Kontrollbande (C) erlaubt, wird eine zusätzliche Validierung durchgeführt. Falls die Signalintensität der Kontrollbande (C) nach der Inkubation von 22 Minuten einen bestimmten Wert unterschreitet, ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.

STANDARDISIERUNGUND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- Der Lateral Flow Assay ist gegen das Referenzmaterial NIBSC 85/506 kalibriert.
- Der BÜHLMANN Quantum Blue® Reader verwendet eine Lot-spezifische Standardkurve zur Berechnung der CRP Konzentration. Diese Standardkurve wird anhand von Richtigkeitsproben mit definierten CRP-Konzentration berechnet
- Zur quantitativen Bestimmung von Proben oberhalb von 20 mg/L, wird das Serum 1:250 verdünnt mit Chase Puffer und erneut bestimmt. Die gemessene Konzentration muss dann mit dem Verdünnungsfaktor mit 25 multipliziert werden, um das Endergebnis zu erhalten.

LEISTUNGSMERKMALE

- **Limit of Blank (LoB): ≤0.34 mg/L CRP**. Der LoB wurde berechnet nach dem CLSI Protokoll EP17-A in 3 unabhängigen Läufen unter Verwendung von 3 verschiedenen Testkassetten Lots mit insgesamt 60 Blank Werten, bei denen CRP freies Serum als Probe eingesetzt wurde.
- **Limit of Detection (LoD): ≤0.61 mg/L CRP.** Die LoD wurde ermittelt mit Hilfe von niedrigen CRP Seren. Die Proben wurden in 3 unabhängigen Läufen von 20 Replikaten gemessen. Die LoD wurde berechnet unter Verwendung der mittleren Standardabweichung der Proben in Übereinstimmung mit dem CLSI Protokoll EP17-A.
- **Limit of Quantification, LoQ: Lower LoQ: ≤1.0 mg/L CRP; Upper LoQ: ≥25 mg/L CRP**. The LoQ wurde ermittelt mit Hilfe eines Präzisionsprofils. Die Nachweisgrenze entspricht derjenigen CRP Konzentration, die eine Streuung von <25 % CV zeigt und damit eine quantitative Bestimmung innerhalb eines Bereiches von 1.0 (unterer LoQ) und 25 mg/L (oberer LoQ). Siehe Table 6.
- **Messbereich:** Der Messbereich des Teste liegt zwischen 1.0 und 25 mg/L.
- **Präzision: Repeatability: ≤19.3 % CV. Total Präzision: ≤24.0 % CV.** Die Repeatability des Quantum Blue® CRP Assays wurde mit Hilfe von 6 Proben, die mit gereinigtem CRP angereichert wurden und den gesamten Assaybereich abdeckten gemäss CLSI EP5-A2 berechnet. Jede Probe wurde gemäß der Testanleitung in einem Lauf mit je 20 Replikaten angesetzt und gemessen. Die Mittelwerte von 3 verschiedenen Lots von Testkassetten werden in Table 7 dargestellt. Die Repeatability lag unterhalb von 20 % CV.
- **Inter-lot Präzision: ≤24.3 % CV; Interlabor Präzision: ≤25.2 % CV.** Die Inter-Lot Präzision des Quantum Blue® CRP Assays wurde berechnet mit 6 Proben, die mit gereinigtem CRP supplementiert wurden und den gesamten Assaybereich abdeckten. Jede Probe wurde gemäss der Testdurchführung in einem Ansatz unter Verwendung von drei Lots in jeweils 20 Replikaten gemessen. Die Mittelwerte der drei Testkassetten Lots sind in Table 8 dargestellt.
- **Linearität:** Eine Probe mit 65 mg/L CRP wurde aus CRP-freiem Serum und CRP Stocklösung hergestellt. Die Probe wurde in 16 Stufen mit CRP-freiem Serum verdünnt und anschliessend auf 4 Testkassetten getestet. Der Mittelwert jeder Verdünnung wurde gemäss CLSI EP6-A berechnet. Linearität konnte zwischen 0.80 und 35 mg/L gezeigt werden. (Siehe Table 9).
- **Wiederfindung: 80-120 %**. Eine Probe mit 65 mg/L CRP wurde aus CRP-freiem Serum und CRP Stocklösung hergestellt. Die Probe wurde in 16 Stufen mit CRP-freiem Serum verdünnt und anschließend auf 4 Testkassetten getestet. Der Mittelwert jeder Probe wurde berechnet. Die Wiederfindung zwischen 80-120 % wurde zwischen 0.8 und 35 mg/L erreicht. Mit einer zusätzlichen Verdünnung von 1:25 bis zu 100 mg/L
- **High Dose Hook Effekt:** Bis zu einer Konzentration von 200 mg/L CRP wurde kein High Dose Hook Effekt beobachtet.
- **Methodenvergleich:** R2 = 0.96; y=1.063x

  22 Proben wurden mit dem KoneLab CRP High Sensitivity verglichen. Die Ergebnisse sind in Figure 2 dargestellt.

INTERFERENZEN

Interferenzen wurden gemäss CLSI Protokoll EP7-A2 getestet.

Stark hämolytische, lipämische oder ikterische Proben mit CRP Konzentrationen bis zu 2 mg/L können mit dem Test interferieren und falsch erhöhte CRP-Werte von bis zu bis zu 40 % ergeben: Die folgenden Substanzen wurden getestet: Triglyzeride (Intralipid® 13.2 mg/ml), konjugiertes

Bilirubin (0.2 mg/ml), unkonjugiertes Bilirubin (0.29 mg/ml) und Hämoglobin (2 mg/ml).

Andre Substanzen und/oder Faktoren sind nicht untersucht worden. Weitere Interferenzen können nicht ausgeschlossen werden.

ERWARTETE WERTE

Die folgenden Referenzintervalle für Serum (97.5th Perzentile) wurden mit asymptomatischen Blutspendern ermittelt:

97.5thPerzentile:	4.76 mg/L
Median:	1.12 mg/L
n = 99	

LEISTUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

Temperatur
Der Assay muss bei einer Temperatur von 18-22 °C durchgeführt werden.

FRANCAIS

USAGE PRÉVU

Le test immunochromatographique Quantum Blue® pour protéine C réactive (CRP) est un test dit « sandwich » (à deux sites) conçu pour la détermination quantitative de la CRP dans le sérum humain au moyen du lecteur Quantum Blue® de BÜHLMANN.

PRINCIPE DU TEST

Le test mesure quantitativement l'antigène de la CRP via un test immunochromatographi que dit « sandwich ». Un anticorps monoclonal (AcM) de capture présentant une spécificité élevée envers la CRP est déposé sur la membrane de test. Un second anticorps monoclonal de détection conjugué à de l'or colloïdal est déposé sur le dispositive de libération des conjugué et libéré dans le système après l'ajout de l'échantillon à tester. Le conjugué or + CRP/anti-CRP se lie à l'anticorps anti-CRP déposé sur la membrane de test (ligne de test ; bande de test) ; le conjugué or + anti-CRP libre résiduel se lie à l'anticorps de chèvre anti-souris déposé sur la membrane de test (ligne de contrôle ; bande de contrôle). Les intensités de signal respectives de la ligne de test et de la ligne de contrôle font l'objet d'une mesure quantitative par le lecteur Quantum Blue® de BÜHLMANN.

RÉACTIFS INCLUS ET PRÉPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Remarques
Cartouches d'essai En sachet aluminium sous vide	25	B-LFCRP-TC	
Tampon d'dilution	1 flaconde 10 ml	B-LFCRP-CB	Prêt à l'emploi
Carte à puce RFID rouge	1	B-LFCRP-RCCR	Employer avec Firmware 1.0.4.x
Carte à puce RFID blanche	1	B-LFCRP-RCC	Employer avec Firmware 2.2.17

Table 3

STOCKAGE ET DURÉE DE CONSERVATION DES RÉACTIFS

Tous les constituants du kit sont stables entre 2 et 8 °C jusqu'à la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.

MATÉRIEL REQUIS

- Pipettes de précision à extrémités jetables : 10-200 µl
- Tubes pour la dilution des échantillons
- Minuteur (facultatif)
- Quantum Blue® Reader (code de commande: BI-TR-ABS)
- Gants et blouse de laboratoire

PRÉLÈVEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Le test nécessite moins de 50 µL de sérum.
Prélever le sang dans des tubes ordinaires de prélèvement par ponction veineuse (pour sérum), en évitant l'hémolyse. Homogénéiser en retournant plusieurs fois le tube et laisser coaguler pendant 45 minutes à la température ambiante (18 à 28 °C), à l'abri de la lumière. Centrifuger à 1800 x g pendant 15 minutes à la température ambiante (18 à 28 °C) et recueillir le sérum. Ne pas soumettre les échantillons à une inactivation thermique.
Les échantillons de sérum peuvent être conservés 7 jours à une température comprise entre 2 et 8 °C. Placer les échantillons à -20 °C pour les conserver plus longtemps. Les échantillons sont stables pendant au moins 4 mois.
Note : l'utilisation d'échantillons lipémiques, hémolysés ou ictériques doit être validée pour ce test. Les échantillons lipémiques peuvent être évités en demandant au patient d'être à jeun pendant au moins 12 h avant la prise de sang.

PROCÉDURE DE TEST

La procédure de test comprend deux parties distinctes :

1. **Dilution des échantillons** de sérum avec le tampon de dilution

   Avant la mesure, diluer l'échantillon de sérum avec le tampon de dilution selon un rapport de dilution 1:10.

   Par exemple : mélanger 15 µl d'échantillon de sérum avec 135 µl de tampon de dilution (B-LFCRP-CB) dans un tube à essai.

2. **Réalisation du test et interprétation**

   Placer 100 µl d'échantillon de sérum dilué sur l'orifice de chargement de la cartouche d'essai.

3. **Dosage en flux latéral et lecture du résultat**

Le lecteur Quantum Blue® Reader propose deux méthodes : <CRP_22> et <CRP_0>. Choisir l'une des méthodes avant de procéder à l'essai.

Charger les paramètres spécifiques au lot de réactif au moyen de la carte à puce RFID.

1. Méthode <CRP_22> avec minuteur interne

- Charger la cartouche de test dans le tiroir du lecteur.
- Ajouter 100 µL d'échantillon dilué via l'orifice de chargement de la cartouche de test.
- Fermer le tiroir et lancer l'analyse en appuyant sur le bouton de démarrage.
- La lecture démarre automatiquement après un délai de 22 minutes (1320 s).

2. Méthode <CRP_0> sans minuteur interne

- Ajouter 100 µL d'échantillon dilué via l'orifice de chargement de la cartouche d'essai.
- Incuber pendant (22 +/- 1) minutes en utilisant un minuteur externe.
- Charger la cartouche de test dans le tiroir du lecteur.
- Lancer immédiatement la lecture de la cartouche en appuyant sur le bouton de démarrage <ENTER> du lecteur Quantum Blue®.

Remarque : consulter le mode d'emploi du Quantum Blue® Reader pour plus de détails concernant les fonctions de base, l'initialisation et l'utilisation du lecteur, en particulier comment choisir la méthode de test et charger les paramètres de lot de la carte à puce RFID en vue de mesurer des échantillons.

PRÉCAUTIONS

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Les échantillons peuvent présenter un risque biologique (virus de l'hépatite B ou VIH, par exemple). Ils doivent être manipulés avec toutes les précautions nécessaires.
- S'assurer que les coupures, abrasions et lésions cutanées sont correctement protégées et prendre les précautions nécessaires pour éviter une auto-inoculation ou l'aspersion de muqueuses.
- Porter des équipements de protection individuelle adaptés pour éviter les contacts oculaires et cutanés.
- Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément à la réglementation en vigueur.

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes. Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Le test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte, de modification ou de stockage des réactifs dans des conditions autres que celles détaillées à la rubrique « Stockage et durée de conservation des réactifs ».
- Éviter la contamination des réactifs.
- Laisser les réactifs se stabiliser à la température ambiante. Bien mélanger (au vortex) les réactifs avant utilisation.
- Les cartouches d'essai sont à usage unique.
- Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations résultant de l'examen clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.

CONTRÔLE QUALITÉ

- Le présent mode d'emploi doit être parfaitement compris pour une utilisation réussie du produit. Seul le respect complet du présent mode d'emploi garantit l'obtention de résultats fiables.
- Une manipulation incorrecte des échantillons prélevés sur le patient peut donner lieu à des résultats inexacts.
- Si la fidélité du test ne correspond pas aux limites établies et que sa répétition permet d'écarter les erreurs techniques, vérifier les points suivants : i) dispositifs de pipetage, de régulation de la température et de chronométrage, ii) dates d'expiration des réactifs et iii) conditions de stockage et d'incubation.

VALIDATION DES RÉSULTATS

- Pour que le résultat du test soit valide, la ligne de contrôle (C) doit être visible dans tous les cas (voir les figures 1A et 1B). Cette ligne constitue uniquement un témoin fonctionnel et elle ne donne aucune indication pour l'interprétation de la ligne de test (T). Si la ligne de test (T) est indétectable après 22 minutes d'incubation (figure 1A), la concentration de CRP dans l'échantillon sanguin est inférieure à la limite de détection. Si la ligne de test (T) est détectable après 22 minutes d'incubation (figure 1B), la concentration de CRP dans l'échantillon sanguin est calculée par le lecteur Quantum Blue®.
- Si seule la ligne de test (T) est détectable après 22 minutes d'incubation (figure 1C), le résultat du test n'est pas valide et le test CRP doit être recommencé avec une autre cartouche.
- Si ni la ligne de test (T), ni la ligne de contrôle (C) ne sont détectables après 22 minutes d'incubation (figure 1C), le résultat du test n'est pas valide et le test CRP doit être répété avec une autre cartouche.
- Étant donné que le lecteur Quantum Blue® réalise une évaluation quantitative des lignes de test (T) et de contrôle (C), un contrôle de validité supplémentaire de la ligne de contrôle (C) est nécessaire. Si l'intensité de signal de la ligne de contrôle (C) est inférieure au seuil indiqué après 22 minutes d'incubation, le résultat du test n'est pas valide et le test CRP doit être répété avec une autre cartouche.

NORMALISATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Le test immunochromatographique est étalonné par rapport au matériel de référence NIBSC 85/506.
- Le lecteur Quantum Blue de BÜHLMANN® emploie une courbe d'étalonnage spécifique à chaque lot pour calculer la concentration de protéine CRP. Cette courbe d'étalonnage spécifique au lot est générée à partir d'échantillons mélangés pour contrôle qualité de concentrations en CRP connues.
- Lorsque l'indication donnée par le lecteur dépasse 20 mg/L, diluer l'échantillon de sérum concerné selon un

rapport 1:250 avec le tampon de dilution, puis recommencer la procédure de test avec une nouvelle cartouche. Multiplier la concentration indiquée par un facteur inverse au rapport de dilution x 25 pour obtenir le résultat final.

- Les valeurs de CRP doivent être utilisées comme des informations supplémentaires par le médecin pour établir son diagnostic.

DONNÉES DE PERFORMANCE

- **Limite du blanc (LDB) : ≤ 0,34 mg/L CRP.** La LDB a été déterminée conformément au protocole EP17-A du CLSI, via trois analyses indépendantes portant sur trois lots différents de cartouches d'essai, pour un total de 60 valeurs de blanc, en utilisant comme échantillon du sérum dépourvu de CRP.
- **Limite de détection (LDD) : ≤ 0,61 mg/L CRP.** La LDD a été déterminée à partir de sérum bas de CRP. Les échantillons ont été testés sur trois lots différents de cartouches d'essai via trois analyses indépendantes comportant chacune 20 répétitions. Les écarts-types moyens ont été déterminés et la LDD a été calculée conformément au protocole EP17-A du CLSI.
- **Limites de quantification (LDQ). LDQ inférieure : ≤ 1,0 mg/L CRP ; LDQ supérieure : ≥ 25 mg/L CRP.** La LDQ a été déterminée à partir du profil de fidélité présenté ci-après. La limite de quantification correspond à la concentration de CRP avec un manque de fidélité inférieur à 25 % du CV, ce qui permet un dosage quantitatif entre 1.0 (LDQ inférieure) et 25 mg/L (LDQ supérieure). Voir la Table 6.
- **Plage dynamique :** la plage s'établit entre 1.0 et 25 mg/L pour le test.
- **Fidélité. Répétabilité : ≤ 19,3 % du CV.** Fidélité totale : ≤ 24,0 % du CV. La répétabilité du test Quantum Blue® CRP a été calculée à partir de 6 échantillons supplémentés avec CRP couvrant la totalité de la plage d'essai test, conformément au protocole EP5-A2 du CLSI. Chaque échantillon a été testé selon la procédure d'essai lors d'une analyse comprenant 20 répétitions pour chacun de trois lots différents. Les valeurs moyennes obtenues pour les trois lots de cartouches d'essai sont présentées dans la Table 7. La répétabilité est inférieure à 20 % du CV.
- **Fidélité entre lots : ≤ 24,3 % CV ; fidélité entre laboratoires : ≤ 25,2 % du CV.** La fidélité du test Quantum Blue® CRP entre lots et entre laboratoires a été calculée à partir de 6 échantillons supplémentés avec CRP couvrant la totalité de la plage d'essai. Chaque échantillon a été testé selon la procédure de test lors d'une analyse comprenant 20 répétitions pour chacun de trois lots différents. Les valeurs moyennes obtenues pour les trois lots de cartouches d'essai sont présentées dans la Table 8.
- **Linéarité :** un échantillon contenant 65 mg/L de CRP a été préparé à partir de sérum dépourvu de CRP et de solution mère de CRP. L'échantillon a été dilué en 16 étapes avec du sérum dépourvu de CRP, puis il a été testé sur quatre cartouches d'essai. La moyenne a été calculée conformément au protocole EP6-A du CLSI pour chaque dilution. Les résultats ont produit une linéarité entre 0,80 et 35 mg/L (voir la Table 9).
- **Récupération : 80-120 %.** Un échantillon contenant 65 mg/L de CRP a été préparé à partir de sérum dépourvu de CRP et de solution mère de CRP. L'échantillon a été dilué en 16 étapes avec du sérum dépourvu de CRP, puis il a été testé sur quatre cartouches d'essai. La moyenne a été calculée pour chaque concentration. Le taux de récupération obtenu est acceptable entre 0,8 et 35 mg/L, ainsi qu'après une dilution supplémentaire de 1:25 à 100 mg/L.
- **Effet crochet à dose élevée :** aucun effet crochet n'a été observé jusqu'à la concentration de 200 mg/L.
- **Comparaison des méthodes : R2 = 0,96 ; y = 1,063x**

  22 échantillons ont été comparés avec le KoneLab CRP High Sensitivity. Les données de corrélation sont présentées sur la figure Figure 2.

INTERFÉRENCES

Les substances donnant lieu à des interférences ont été évaluées conformément au protocole EP-A2 du CLSI.

Les échantillons fortement hémolysés, lipémiques ou ictériques ayant une concentration en CRP inférieure ou égale à 2 mg/L sont susceptibles d'interférer avec le test, en produisant des taux de CRP faussement élevés de 40 %. Les substances suivantes ont été testées : **triglycérides** (**Intralipid®** 13,2 mg/mL), **bilirubine conjuguée** (0,2 mg/mL), **bilirubine non conjuguée** (0,29 mg/mL) et **hémoglobine** (2 mg/mL).

Aucun autre facteur ni substance n'a été testé lors de cette étude. Le risque d'interférences ne peut être écarté.

VALEURS ATTENDUES

L'intervalle de référence suivant pour le sérum (97,5e centile) a été déterminé à partir de donneurs de sang asymptomatiques :

97,5e percentile	4,76 mg/L
Médiane :	1,12 mg/L
n = 99	

FACTEURS LIMITANT LA PERFORMANCE

Température

Le test doit être réalisé à une température comprise entre 18 et 22 °C.

ITALIANO

USO PREVISTO

L'analisi di flusso laterale per la proteina C-reattiva Quantum Blue® è un immunodosaggio a sandwich studiato per la determinazione quantitativa della CRP nel siero umano in combinazione con il lettore BÜHLMANN Quantum Blue®.

PRINCIPIO DELL'ANALISI

L'esame è studiato per la misurazione selettiva dell'antigene CRP mediante un immunodosaggio a sandwich. Un anticorpo monoclonale di cattura (mAb) altamente specifico per la CRP riveste la membrana di rilevazione. Un secondo anticorpo monoclonale di rilevazione, coniugato a oro colloidale e deposto sul supporto di rilascio del coniugato, viene rilasciato nel sistema di reazione in seguito all'aggiunta del campione in esame. Il complesso CRP/anti-CRP coniugato con oro si lega all'anticorpo anti-CRP legato alla membrana di rilevazione (linea di rilevazione; banda di rilevazione) e l'anti-CRP coniugato con oro in eccesso si lega all'anticorpo caprino antimurino legato alla membrana di rilevazione (linea di controllo, banda di controllo). Le intensità dei segnali della linea di rilevazione e della linea di controllo sono misurate quantitativamente mediante il lettore BÜHLMANN Quantum Blue®.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Commenti
Cartuccia di rilevazione sigillata sottovuoto in una busta di stagnola	25 pezzi	B-LFCRP-TC	
Chase buffer (Tampone di diluzione)	1 flaconcino 10 ml	B-LFCRP-CB	Pronto per l'uso
Carta chip RFID rossa	1 unità	B-LFCRP-RCCR	Utilizzare con Firmware 1.0.4.x
Carta chip RFID bianca	1 unità	B-LFCRP-RCC	Utilizzare con Firmware 2.2.17

Tabella 4

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

Tutti i componenti del kit sono stabili a 2-8 °C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette.

ATTREZZATURA

- Timer (opzionale)
- Pipette di precisione con puntali monouso: 10-200 µl
- Provette di 5 ml per la diluizione degli campioni
- Lettore Quantum Blue® disponibile presso BÜHLMANN (codice di ordinazione: BI-POCTR-ABS)
- Guanti e camice da laboratorio

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Sono necessari meno di 50 µl di siero.

Prelevare il sangue in provette semplici per venipuntura (per siero), evitare l'emolisi, mescolare invertendo le provette diverse volte e lasciar riposare per 45 minuti a temperatura ambiente (18-28 °C) lontano dalla luce, fino alla formazione del coagulo. Centrifugare per 15 minuti a 1800 x g a temperatura ambiente (18-28 °C) e prelevare il siero. Non inattivare i campioni mediante calore.

I campioni di siero possono essere conservati refrigerati a 2-8 °C fino a 7 giorni. Per tempi di conservazione più lunghi, tenere i campioni a -20 °C. I campioni sono stabili per almeno 4 mesi.

Nota: l'uso di campioni lipemici, emolitici e itterici deve essere validato per questa analisi. È possibile evitare di avere campioni lipemici chiedendo ai pazienti di digiunare per almeno 12 ore prima del prelievo del campione.

PROCEDURA DEL TEST

La procedura di analisi è costituita da due parti indipendenti.

1. **Diluizione dei campioni di siero** con il tampone di diluzione

   Prima di eseguire la misurazione, diluire il campione di siero 1:10 con il tampone di diluzione.

   Ad esempio: mescolare 15 µl di campione di siero con 135 µl di tampone di diluzione (B-LFCRP-CB) in una provetta.

2. **Analisi di flusso laterale/Lettura**

   Aggiungere 100 µl di campione di siero diluito sull'apertura per il caricamento del campione della cartuccia di rilevazione.

3. **Dosaggio a flusso laterale e lettura**

   Esistono due metodi alternativi disponibili sul Quantum Blue® Reader: <CRP_22> e <CRP_0>. Prima di iniziare gli esperimenti, selezionare uno di questi metodi.

Caricare i parametri specifici del lotto dalla carta chip RFID.

1. Metodo <CRP_22> con timer interno
   - Caricare la cartuccia di test sul supporto per cartuccia di test del Reader
   - Aggiungere 100 µl di campione di siero diluito sulla porta di carico del campione della cartuccia di test
   - Chiudere il supporto per cartuccia e iniziare la misurazione premendo il pulsante di avvio
   - La scansione inizia automaticamente dopo 22 minuti (1320 secondi).
2. Metodo <CRP_0> senza timer interno
   - Aggiungere 100 µl di campione di siero diluito sulla porta di carico del campione della cartuccia di test
   - Incubare per 22 minuti +/- 1 minuto (impostare un timer manuale)
   - Caricare la cartuccia di test sul supporto per cartuccia di test del Reader
   - Scansionare la cartuccia con il Quantum Blue® Reader premendo il pulsante (<ENTER>) immediatamente.

Nota: Per informazioni sulle funzioni di base e su come avviare e mettere in funzione il Reader, in particolare per informazioni sulla selezione dei metodi di test e su come caricare i parametri specifici del lotto dalla carta chip RFID per ottenere i campioni misurati, consultare il manuale del Quantum Blue® Reader.

PRECAUZIONI

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- I campioni dei pazienti devono essere trattati come materiali potenzialmente a rischio biologico (ad es. epatite B e HIV). Prendere adeguate precauzioni.
- Assicurarsi che tagli, abrasioni e lesioni cutanee siano protetti adeguatamente e prendere delle precauzioni per evitare auto-inoculazione o spruzzi di membrane mucose.
- Indossare indumenti di protezione personale adeguati, così da evitare il contatto con gli occhi e la pelle.
- Smaltire la soluzione inutilizzata nel rispetto delle disposizioni locali, regionali e nazionali in materia.

PRECAUZIONI TECNICHE

- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza stampata sulle etichette. Non mescolare diversi lotti di reagenti.

- Le prestazioni del test saranno influenzate negativamente nel caso in cui i reagenti non siano correttamente diluiti, siano modificati o siano conservati in condizioni diverse da quelle indicate nella sezione: conservazione e durata dei reagenti.
- Evitare la contaminazione dei reagenti.
- Attendere che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Mescolare bene (con vortex) i reagenti prima dell'uso.
- Le cartucce non possono essere riutilizzate.
- I risultati del test devono essere interpretati assieme alle informazioni derivanti dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.

CONTROLLO DI QUALITÀ

- L'utilizzo corretto del prodotto è subordinato alla comprensione approfondita delle presenti istruzioni per l'uso. Soltanto seguendo esattamente le istruzioni per l'uso si potranno ottenere risultati affidabili.
- I campioni dei pazienti manipolati in maniera inadeguata possono dare risultati inesatti.
- Se la precisione dell'analisi non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude errori tecnici, verificare i seguenti aspetti: i) dispositivi di pipettatura, di controllo della temperatura e di misurazione del tempo, ii) date di scadenza dei reagenti e iii) condizioni di conservazione e incubazione.

VALIDAZIONE DEI RISULTATI

- Per un risultato valido, la linea di controllo (C) deve essere visibile in ogni caso (vedere Figure 1A e 1B). È utilizzata soltanto come controllo funzionale del test e non può essere usata per interpretare la linea di rilevazione (T). Se la linea di rilevazione (T) non è individuabile dopo un tempo di incubazione di 22 minuti (Figura 1A), significa che la concentrazione di CRP presente nel campione ematico è inferiore al limite di rilevazione. Se la linea di rilevazione (T) è individuabile dopo un tempo di incubazione di 22 minuti (Figura 1B), significa che la concentrazione di CRP presente nel campione ematico è stata calcolata dal lettore Quantum Blue®.
- Se dopo un tempo di incubazione di 22 minuti è visibile soltanto la linea di rilevazione (T) (Figura 1C), il risultato non è valido e l'analisi della CRP deve essere ripetuta utilizzando un'altra cartuccia di rilevazione.
- Se dopo un tempo di incubazione di 22 minuti non è visibile né la linea di controllo (C) né quella di rilevazione (T) (Figura 1D), il risultato non è valido e l'analisi della CRP deve essere ripetuta utilizzando un'altra cartuccia di rilevazione.
- Poiché il lettore Quantum Blue® consente una valutazione quantitativa delle linee di rilevazione (T) e di controllo (C), viene eseguita un'ulteriore verifica della validità della linea di controllo (C). Se, dopo un tempo di incubazione di 22 minuti, l'intensità del segnale della linea di controllo (C) è inferiore a una determinata soglia, il risultato non è comunque valido e l'analisi della CRP deve essere ripetuta utilizzando un'altra cartuccia di rilevazione.

STANDARDIZZAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- L'analisi di flusso laterale è calibrata secondo il materiale di riferimento NIBSC 85/506.
- Il lettore BÜHLMANN Quantum Blue® utilizza una curva standard specifica per il lotto per calcolare la concentrazione di CRP. Tale curva standard specifica per il lotto viene generata con pool di campioni del controllo qualità con concentrazioni note di CRP.
- Per la misurazione quantitativa di campioni superiori a 20 mg/l, diluire i campioni 1:250 con il tampone di diluzione e analizzarli nuovamente seguendo la procedura. La concentrazione misurata deve quindi essere moltiplicata per il fattore del volume reciproco x 25 per ottenere il risultato finale.
- I valori di CRP devono essere utilizzati come dati supplementari a disposizione del medico per l'elaborazione di una diagnosi.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

- **Limite del Bianco (LoB): ≤0,34 mg/l CRP.** Il LoB è stato determinato in conformità al protocollo CLSI EP17-A in tre analisi indipendenti utilizzando tre diversi lotti di cartucce di rilevazione con un totale di 60 valori di bianco, utilizzando come campione del sieroprivo di CRP.
- **Limite di rilevabilità (LoD) ≤0,61 mg/l CRP.** Il LoD è stato stabilito mediante siero basso di CRP. I campioni sono stati misurati con tre diversi lotti di cartucce di rilevazione in tre analisi indipendenti di 20 repliche ciascuna. Sono stati calcolati i valori DS medi e il LoD ricavato è stato misurato in conformità al protocollo CLSI EP17-A.
- **Limite di Quantificazione, LoQ: LoQ inferiore: ≤1,0 mg/l CRP; LoQ superiore: ≥25 mg/l CRP.** Il LoQ è stato stabilito con l'ausilio del profilo di precisione. Il limite di quantificazione corrisponde alla concentrazione di CRP con una imprecisione inferiore al 25% del CV, consentendo una misurazione quantitativa compresa tra 1,0 (LoQ inferiore) e 25 mg/l (LoQ superiore). Fare riferimento alla Table 6 .
- **Gamma dinamica:** La gamma di analisi è compresa tra 1,0 e 25 mg/l.
- **Precisione: Riproducibilità: ≤19,3% del CV.** Precisione totale: ≤24,0% del CV. La riproducibilità dell'analisi della CRP Quantum Blue® è stata calcolata in 5 campioni mescolati con siero privo di CRP compresi nella gamma di analisi in conformità al protocollo CLSI EP5-A2. Ciascun campione è stato testato in base alla procedura di analisi in un'unica analisi, utilizzando tre lotti con 20 repliche ciascuno. I valori medi dei tre lotti diversi di cartucce di rilevazione sono indicati nella Table 7. La riproducibilità era inferiore al 20% del CV.
- **Precisione tra lotti: ≤24,3% del CV;** precisione tra laboratori: ≤25,2% del CV. La precisione tra lotti e tra laboratori dell'analisi della CRP Quantum Blue® è stata calcolata in 6 campioni di siero privo di CRP supplementati con CRP purificato compresi nella gamma di analisi. Ciascun campione è stato testato in base alla procedura di analisi in un'unica analisi, utilizzando tre lotti con 20 repliche ciascuno. I valori medi dei tre lotti diversi di cartucce di rilevazione sono indicati nella Table 8.
- **Linearità:** è stato prodotto un campione contenente 65 mg/l di CRP utilizzando siero privo di CRP e una soluzione madre di CRP. Il campione è stato diluito in 16 fasi utilizzando siero privo di CRP e successivamente analizzato su quattro cartucce di rilevazione. La media è stata calcolata per ciascuna diluizione in conformità al protocollo CLSI EP6-A. Il risultato ha mostrato linearità tra 0,80 e 35 mg/l (fare riferimento alla Table 9).
- **Recupero: 80-120%**. È stato prodotto un campione contenente 65 mg/l di CRP utilizzando siero privo di CRP e una soluzione madre di CRP. Il campione è stato diluito in 16 fasi utilizzando siero privo di CRP e successivamente analizzato su quattro cartucce di

rilevazione. La media è stata calcolata per ciascuna concentrazione. Il recupero si è dimostrato accettabile tra 0,8 e 35 mg/l e con una diluizione aggiuntiva di 1:25 fino a 100 mg/l. Il recupero variava dall'80 al 120%.

- **Effetto gancio da dosi alte:** non è stato osservato effetto gancio da dosi alte fino a una concentrazione di 200 mg/l.
- **Confronto tra metodi:** R2 = 0,96; y=1,063x

  22 campioni sono stati confrontati con KoneLab CRP High Sensitivity. I dati della correlazione sono indicati nella Figure 2.

SOSTANZE INTERFERENTI

Le sostanze interferenti sono state valutate in conformità al protocollo CLSI EP7-A2.

I campioni fortemente emolitici, lipemici o itterici con concentrazione di CRP fino a 2 mg/l potrebbero interferire con il test determinando di falsi risultati di CRP fino al 40% elevata. Sono state testate le seguenti sostanze: **trigliceridi** (**Intralipid®** 13,2 mg/ml), **bilirubina coniugata** (0,2 mg/ml), **bilirubina non coniugata** (0,29 mg/ml) o **emoglobina** (2 mg/ml).

Altre sostanze e/o fattori non sono stati esaminati in questo studio. Non possono escludersi interferenze.

VALORI ATTESI

È stato determinato il seguente intervallo di riferimento per il siero (97,5° percentile) proveniente da donatori di sangue asintomatici:

97,5° percentile 4,76 mg/l

Valore mediano: 1,12 mg/l

n = 99

LIMITAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Temperatura

L'analisi deve essere eseguita a una temperatura compresa tra 18 e 22 °C.

ESPAÑOL

USO PREVISTO

El ensayo de flujo lateral Quantum Blue® CRP es un inmunoensayo tipo sándwich diseñado para la determinación cuantitativa de la proteína C reactiva (CRP) en suero humano en combinación con el lector BÜHLMANN Quantum Blue®.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El análisis ha sido diseñado para la medición selectiva del antígeno CRP mediante un inmunoensayo tipo sándwich. La membrana de análisis lleva un recubrimiento de un anticuerpo de captura monoclonal altamente específico para CRP. Un segundo anticuerpo de detección monoclonal, conjugado con oro coloidal, se deposita en la almohadilla de liberación del conjugado para su liberación al sistema de reacción tras la adición de la muestra que se va a analizar. El conjugado de oro anti-CRP con CRP se une al anticuerpo anti-CRP que recubre una zona de la membrana de análisis (línea de test; banda de test) mientras que el resto del conjugado de oro anti-CRP libre se une al anticuerpo de cabra antirratón que recubre asimismo otra zona de la membrana de análisis (línea de control; banda de control). Las intensidades de señal correspondientes a la línea de test y la línea de control respectivamente se miden de manera cuantitativa con el lector BÜHLMANN Quantum Blue®.

REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Comentarios
Cartucho de prueba sellado al vacío en una bolsa de aluminio	25 unidades	B-LFCRP-TC	
Chase buffer (Tampón de incubación)	1 vial 10 ml	B-LFCRP-CB	Listo para usar
Tarjeta chip RFID roja	1 unidad	B-LFCRP-RCCR	Utilizar con Firmware 1.0.4.x
Tarjeta chip RFID blanca	1 unidad	B-LFCRP-RCC	Utilizar con Firmware 2.2.17

Tabla 5

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes del kit son estables a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.

EQUIPO

- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10 a 200 µl
- Cronómetro (opcional)
- Tubos para la dilución de los muestras
- Lector Quantum Blue® de BÜHLMANN (código para pedidos: BI-POCTR-ABS)
- Guantes y bata de laboratorio

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El procedimiento requiere menos de 50 µl de suero.

Recoja la sangre en tubos para venopunción vacíos (para suero) evitando la hemólisis, mézclela invirtiendo el tubo de muestra varias veces y déjela coagular durante 45 minutos a temperatura ambiente (entre 18 y 28 ºC) protegida de la luz. Centrifúguela a 1800 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente (entre 18 y 28 ºC) y recoja el suero. No desactive las muestras por acción del calor.

Las muestras de suero se pueden conservar refrigeradas a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta un máximo de 7 días. Para períodos de conservación más largos, hay que mantenerlas a -20 ºC. Las muestras son estables durante al menos 4 meses.

Nota: *El uso de muestras lipémicas, hemolíticas o ictéricas debe ser validado para este ensayo.* Es posible evitar la obtención de muestras lipémicas pidiendo a los pacientes que ayunen durante al menos las 12 horas previas a la recogida de la sangre.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

El procedimiento de ensayo consta de dos partes individuales:

1. Dilución de las muestras de suero con tampón de detección

   Antes de proceder a la medida, diluya la muestra de suero en proporción 1:10 con tampón de detección.

   Por ejemplo: Mezcle 15 µl de muestra de suero con 135 µl de tampón de detección (B-LFCRP-CB) en un tubo de ensayo.

2. Ensayo de flujo lateral / Lectura de los resultados

   Añada 100 µl de muestra de suero diluida al puerto de carga de muestra del cartucho de análisis.

3. **Procedimiento de ensayo de flujo lateral y lectura de los resultados**

En el lector Quantum Blue® Reader hay dos métodos alternativos disponibles: <CRP_22> y <CRP_0>. Seleccione uno de esos métodos antes de iniciar los experimentos.

Cargue los parámetros específicos del lote desde la tarjeta chip RFID.

1. . Método <CRP_22> con cronómetro interno

- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del lector.
- Añada 100 µl de muestra de suero diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Cierre el portacasetes e inicie la medición pulsando el botón de inicio.
- El barrido se inicia automáticamente pasados 12 minutos (1320 segundos).

2. Método <CRP_0> sin cronómetro interno

- Añada 100 µl de muestra de suero diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Incube la muestra durante 22 minutos +/- 1 minuto (arranque un cronómetro manualmente).
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del lector.
- Inicie el barrido del casete con el lector Quantum Blue® Reader pulsando el botón de inicio (<ENTER>) inmediatamente.

.

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Las muestras de pacientes deben ser manipuladas como potencialmente biopeligrosas (p.ej. portadoras del virus de la hepatitis B y el VIH), tomando las precauciones apropiadas.
- Asegúrese de que cualesquiera cortes, abrasiones u otras lesiones cutáneas cuentan con la protección apropiada y tome precauciones para evitar autoinocularse o salpicar membranas mucosas.
- Utilice equipos de protección personal apropiados para evitar el contacto con los ojos y la piel.
- La solución no utilizada deberá desecharse conforme a las normativas locales, estatales y federales.

MEDIDAS DE PRECAUCIÓN TÉCNICAS

- Los componentes no se deben utilizar más allá de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. No se deben mezclar reactivos de lotes diferentes.
- El rendimiento del análisis se verá adversamente afectado si los reactivos se diluyen de manera incorrecta, se modifican o se conservan en condiciones distintas de las detalladas en: conservación y período de validez de los reactivos.
- Evite la contaminación de los reactivos.
- Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente. Mezcle bien los reactivos (sométalos a vórtex) antes de usarlos.
- Las casetes no pueden ser reutilizadas.
- Los resultados del análisis deben interpretarse de manera conjunta con la información obtenida de la valoración clínica del paciente y otros procedimientos diagnósticos.

CONTROL DE CALIDAD

- Para hacer un uso correcto de este producto es necesario entender en detalle las presentes instrucciones de uso. Únicamente se obtendrán resultados fiables si se siguen con precisión estas instrucciones.
- Una manipulación incorrecta de las muestras de pacientes puede dar lugar a la obtención de resultados inexactos.
- Si la precisión del análisis no se corresponde con los límites establecidos y la repetición excluye posibles errores en la técnica, compruebe los puntos siguientes: i) dispositivos de pipeteado, control de la temperatura y medición del tiempo; ii) fechas de caducidad de los reactivos, y iii) condiciones de conservación e incubación.

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Para que el resultado obtenido en un análisis sea válido, la línea de control (C) debe estar siempre visible (véanse las Figuras 1A y 1B). Dicha línea sirve únicamente como control funcional del análisis y no debe ser utilizada para interpretar la línea de test (T). Si la línea de test (T) no es detectable tras 22 minutos de incubación (Figura 1A), la concentración de CRP presente en la muestra de sangre está por debajo del límite de detección. Si hay una línea de test (T) detectable tras 22 minutos de incubación (Figura 1B), la concentración de CRP presente en la muestra de sangre se calcula por medio del lector Quantum Blue®.
- Si tras los 22 minutos de incubación sólo es detectable la línea de test (Figura 1C), el resultado del análisis no es válido y será necesario repetir el ensayo de determinación de CRP utilizando otro cartucho de análisis.
- Si tras los 22 minutos de incubación no son detectables ni la línea de control (C) ni la línea de test (T) (Figura 1D), el resultado del análisis no es válido y será necesario repetir el ensayo de determinación de CRP utilizando otro cartucho de análisis.
- Puesto que el lector Quantum Blue® permite una evaluación cuantitativa de las líneas de test (T) y control (C), se realiza una comprobación de validez adicional de la línea de control (C). Si la intensidad de señal de la línea de control (C) está por debajo de un determinado umbral tras 22 minutos de incubación, el resultado del análisis tampoco es válido y será necesario repetir el ensayo de determinación de CRP utilizando otro cartucho de análisis.

ESTANDARIZACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- El ensayo de flujo lateral se calibra utilizando el material de referencia NIBSC 85/506.

- El lector BÜHLMANN Quantum Blue® utiliza una curva estándar específica del lote para calcular la concentración de CRP. Dicha curva estándar específica del lote se genera a partir de muestras agregadas de control de calidad con concentraciones conocidas de CRP.
- Para obtener mediciones cuantitativas de muestras con lecturas por encima de 20 mg/l, diluya las muestras de suero en proporción 1:250 con tampón de detección y ensáyelas de nuevo conforme al procedimiento. La concentración así medida debe multiplicarse luego por el inverso del factor de dilución volumétrica x25 para obtener el resultado final.
- Los valores de CRP deben utilizarse como datos complementarios para ayudar al médico a establecer un diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

- **Límite para el blanco (LoB):** ≤0,34 mg/l de CRP. El LoB se ha establecido de acuerdo con el protocolo CLSI EP17-A en tres tandas de lecturas independientes utilizando tres lotes diferentes de cartuchos de análisis con un total de 60 valores de blanco utilizando suero libre de CRP como muestra.
- Límite de Detección (LoD): ≤0,61 mg/l de CRP. El LoD se ha establecido con suero bajo de CRP. Las muestras se midieron con tres lotes diferentes de cartuchos de análisis en tres tandas de lecturas independientes de 20 réplicas cada una. Se determinaron los valores medios de SD y a partir de ahí se ha calculado el LoD de acuerdo con el protocolo CLSI EP17-A.
- Límite de cuantificación (LoQ): LoQ inferior: ≤1,0 mg/l de CRP; LoQ superior: ≥25 mg/l de CRP. El LoQ se ha establecido con el perfil de precisión. El límite de cuantificación corresponde a la concentración de CRP con una imprecisión inferior a 25% CV, permitiendo mediciones cuantitativas en el rango de 1,0 (LoQ inferior) a 25 mg/l (LoQ superior). Ver la Table 6.
- Rango dinámico: El rango de ensayo es entre 1.0 y 25 mg/l.
- Precisión: Repetibilidad: ≤19,3% CV. Precisión total: ≤24,0% CV. La repetibilidad del ensayo Quantum Blue® para CRP se calculó a partir de 6 muestras supplementadas con CRP que cubrían el rango de ensayo conforme a CLSI EP5-A2. Cada muestra se analizó de acuerdo al procedimiento de ensayo en una tanda de lectura utilizando tres lotes con 20 réplicas cada uno. Los valores medios de tres lotes diferentes de cartuchos de análisis se presentan en la Table 7. La repetibilidad estuvo por debajo del 20% CV.
- Precisión interlote: ≤24,3% CV; Precisión interlaboratorio: ≤25,2% CV. La precisión interlote e interlaboratorio del ensayo Quantum Blue® para CRP se calculó a partir de 6 muestras supplementadas con CRP que cubrían el rango de ensayo. Cada muestra se analizó de acuerdo al procedimiento de ensayo en una tanda de lectura utilizando tres lotes con 20 réplicas cada uno. Los valores medios de tres lotes diferentes de cartuchos de análisis se presentan en la Table 8.
- **Linealidad:** Se preparó una muestra con 65 mg/l de CRP utilizando suero extento de CRP y solución patrón de CRP. La muestra se diluyó en 16 pasos utilizando suero libre de CRP y seguidamente se ensayó en cuatro cartuchos de análisis. Para cada dilución se calculó la media conforme a CLSI EP6-A. Los resultados mostraron linealidad entre 0,80 y 35 mg/l. (Véase la Table 9).
- **Recuperación:** 80-120%. Se preparó una muestra con 65 mg/l de CRP utilizando suero extento de CRP y solución patrón de CRP. La muestra se diluyó en 16 pasos y seguidamente se ensayó en cuatro cartuchos de análisis. Se calculó la media correspondiente a cada concentración. La recuperación era aceptable entre 0,8 y 35 mg/l, y con una dilución adicional de 1:25 hasta 100 mg/l. La recuperación variaba entre el 80 y el 120%.
- **Efecto de "gancho" a dosis altas**: No se observó efecto de "gancho" a dosis altas hasta una concentración de 200 mg/l.
- **Comparación de métodos**: R2 = 0,96; y=1.063x Se compararon 22 muestras con el método KoneLab para CRP de alta sensibilidad. Los datos de correlación se ilustran en la Figure 2.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las sustancias interferentes se evaluaron de conformidad con el protocolo CLSI EP7-A2.
Muestras fuertemente hemolíticas, lipémicas o ictéricas con concentraciones de CRP de hasta 2 mg/l pueden interferir con el análisis dando lugar a resultados de CRP falsamente elevados hasta en un 40%: Se ensayaron las sustancias siguientes: triglicéridos (Intralipid® 13,2 mg/ml), bilirrubina conjugada (0,2 mg/ml), bilirrubina no conjugada (0,29 mg/ml) o hemoglobina (2 mg/ml).

En este estudio no se investigaron otras sustancias y/o factores. No es posible excluir interferencias.Valores esperadosA partir de muestras de donantes de sangre asintomáticos se ha determinado el intervalo de referencia.

VALORES ESPERADOS

A partir de muestras de donantes de sangre asintomáticos se ha determinado el intervalo de referencia siguiente para suero (percentil 97,5):

Percentil 97,5:	4,76 mg/l
Mediana:	1,12 mg/l
n = 99	

LIMITACIONES DE RENDIMIENTO

TEMPERATURA
El ensayo debe realizarse a una temperatura de entre 18 y 22 ºC.

Figure 1 Test results

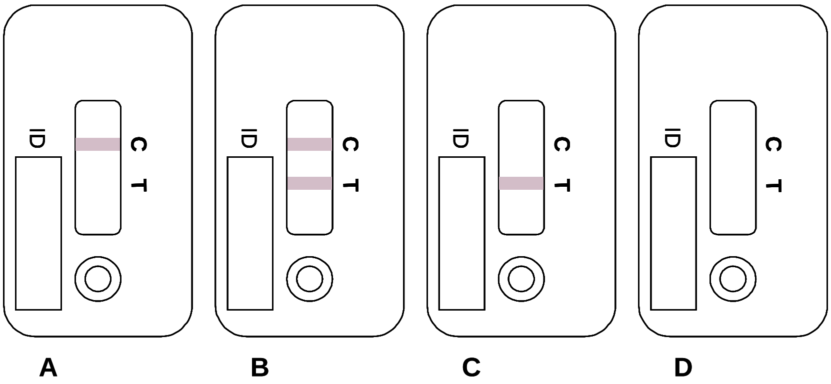


Figure 2: Method comparison LF-CRP with Konelab „CRP High Sensitivity

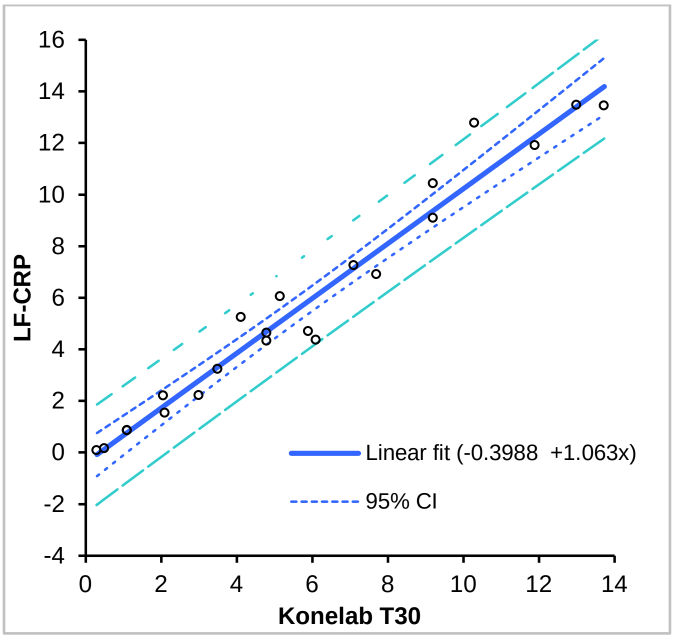


Table 7 Summary of within-lab precision

Sample No.	Concentration [mean mg/L]	Repeatability [CV]	Total Precision [CV]
S1	1.16	17.6%	19.7%
S2	2.30	18.9%	21.8%
S3	3.25	19.3%	22.1%
S4	10.0	14.9%	19.4%
S5	16.5	19.1%	22.7%
S6	23.3	18.5%	24.0%

Table 8: Inter-lot and inter-lab precision

Sample No.	Concentration [mean mg/L]	Inter-Lot Precision [CV]	Inter-Lab Precision [CV]
S1	1.04	21.3%	25.2%
S2	1.9	21.8%	17.9%
S3	2.9	15.4%	15.3%
S4	9.5	13.1%	18.1%
S5	15.9	24.3%	25.1%
S6	20.9	19.0%	23.3%

Table 6: LOB, LOD and LOQ

Lot	LOB (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Lot 1	0.21	0.61	1.0 to 30
Lot 2	0.20	0.52	0.6 to 25
Lot 3	0.34	0.58	0.6 to 25

Table 9: Linearity

Lot	Repeatability	Linear Range	Recovery (mean)
Lot 1	22.6%	0.78 – 43.3 mg/L	108.4%
Lot 2	23.5%	0.83 – 36.7 mg/L	102.0%
Lot 3	24.8%	0.81 – 36.1 mg/L	83.4%

APPENDIX II
REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ REFERENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

1. Powell LJ. C-reactive protein--a review. Am J Med Technol,45(2): 38-42 (1979)
2. Gewurz H, Mold C, Siegel J, Fiedel B. C-reactive protein and the acute phase response. Adv Intern Med. 27:345-72 (1982)
3. Patel VB, Robbins MA, Topol EJ. C-reactive protein: a 'golden marker' for inflammation and coronary artery disease. Cleve Clin J Med. 68(6):521-524, 527-34 (2001)
4. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. The role of C-reactive protein as an inflammatory marker in gastrointestinal diseases. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2(12):580-6 (2005)
5. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys?Gut.55(3):426-31 (2006)

APPENDIX IV
SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device In Vitro Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n" tests Contenuto sufficiente per „n" saggi Contenudo sufficiente para <n> ensayos

Symbol	Explanation
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
TC	Test Cartridge Testkassette Cartouche de testi Card di rilevazione Cartucho de prueba
BUF CHASE	Chase Buffer Laufpuffer Tampon de chase Tampone di chase Tampón de chase
RCC	RFID Chip card RFID Chipkarte RFID Carte à puce RFID Carta chip RFID Tarjeta chip
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso

Printing Date
2013-08-09